

Önszerveződés és hajlékonyság: szubsztrát szelekciós stratégiák oligopeptidázokban

HARMAT Veronika ^{a,b,*}^a Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, Pázmány Péter sétány 1/A, 1117 Budapest, Magyarország^b MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport, Pázmány Péter sétány 1/A, 1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Az ELTE Fehérjekrisztallográfiai Laboratóriumát 1993-ban alapították Náray-Szabó Gábor és Böcskei Zsolt, ezzel elindították a fehérjekrisztallográfiai vizsgálatokat Magyarországon. Az egyik első siker a prolil-oligopeptidáz, egy új enzimes család első képviselőjének szerkezetmegoldása Fülöp Vilmosmal, és az enzimes család felfedezőjével, Polgár Lászlóval együttműködésben.¹ A prolil-oligopeptidáz enzimes családba fiziológias szempontból fontos fehérjék tartoznak (a névadó prolil-oligopeptidáz, a dipeptidil-peptidáz IV, az oligopeptidáz B és az acilaminoacil-peptidáz), amelyek ezért farmakológiai kutatások célpontjai is.^{2,3} Ennek a kutatásnak a folytatása az acilaminoacil-peptidázok (oligopeptidok N-terminális acilezett aminosavat lehasítani képes proteázok) krisztallográfiai vizsgálata, ami az egész enzimes családra általánosítható konklúziókra vezetett a szubsztrát szelekció és enzimaktivitás együttes szabályozási mechanizmusát illetően.

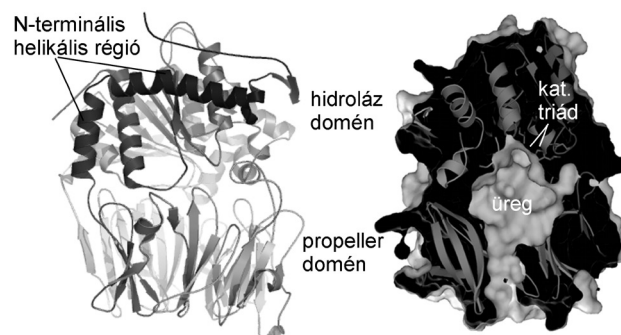
A peptidkötés hidrolízise az élő szervezetben enzimek (proteázok, peptidázok) által katalizált módon megy végbe. Mivel ezek potenciális veszélyt jelentenek a szervezet fő alkotórészeinek lebontása révén, működésük időben és térben korlátozott módon valósul meg. A különböző feladatokra (pl. emésztés, jelátvitel, jelerősítés, pozitív és negatív visszacsatolás, más fehérjék aktivitásának szabályozása, sejtosztódás és -migráció, hibás fehérjék eltávolítása) specializált proteázok szelektivitása és specifikása (milyen típusú fehérjéket, peptideket és azokban milyen aminosav-szekvencia részletet ismer fel és hasít el az enzim) széles skálán mozog. Legtöbbször inaktív formában szintetizálódnak, és ez az előenzim csak a működés helyére való eljuttatás után aktiválódik. Aktivitásukat kofaktorok befolyásolhatják és inhibitorok szabályozzák. Végül lebontásuk is szabályozott módon megy végbe.

2. A prolil-oligopeptidáz család: szerkezet és méretszelekció

A prolil-oligopeptidáz enzimes család tagjai szerin proteázok, a katalitikus apparátust Ser-His-Asp katalitikus triád alkotja, megtalálhatók bennük a klasszikus szerin-proteázokra (kimotripszin és szubtilizin család) jellemző, oxianion kötőhely és a szubsztrát aminosavjait kötő zsebek. A kimotripszin és szubtilizin család tagjaival ellentétben azonban nem előenzim formában szintetizálódnak a szervezetben, hanem rögtön az aktív forma képződik. Csak oligopeptid mérettartományba tartozó szubsztrátokat képesek hasítani, nagyobb, feltekeredett fehérjéket nem.

* Tel.: 1-3722500/6547 ; fax: 1-3722592 ; e-mail: veronika@chem.elte.hu

A szubsztrát méret szerinti szelektálásának szerkezeti hátterére az első kristályszerkezet szolgáltatott magyarázatot: két szerkezeti egységből, doménből állnak, amelyek közül a hidroláz domén hordozza a katalitikus apparátust, a β -propeller domén pedig a méretszelekcióért felelős azáltal, hogy a szubsztrátkötő és katalitikus helyet a két domén közötti üregbe rejti (1. Ábra).



1. Ábra. A sertés prolil-oligopeptidáz szerkezete (PDB kód: 1qfs). Balra: szalagmodell; jobbra: szalagmodell és az enzim molekuláris felszíne, metszeti kép.

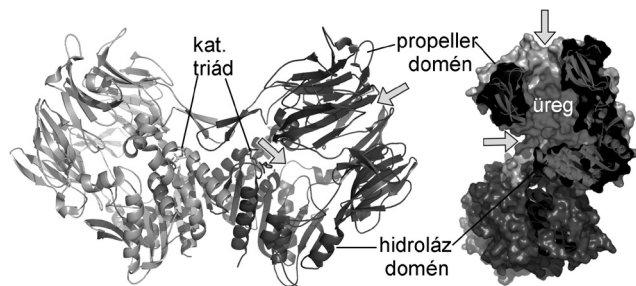
Ebben a szerkezetben az enzim zárt, az üreg belsejébe csak néhány keskeny pórus vezet, ezért nem egyértelmű, hogyan, milyen útvonalon juthat be az üregbe a szubsztrát (és hogyan távoznak a termékek). A propeller domén tengelyében található egy pórus, valamint a két domén között néhány szűk oldalsó nyílás, ezek azonban túlságosan szűkek.

3. A szubsztrát bejutása az aktív helyre

A sertés prolil-oligopeptidáz szerkezetet felhasználva elvégzett molekuladinamikai szimulációk, a molekula mutációkkal (diszulfid-hidak kiépítésével) történő merevítése és enzimkinetikai vizsgálatok arra utaltak, hogy a két domén közötti dinamikának /elmozdulásnak fontos szerepe van a szubsztrát bejutásában. Egy kristályosítási műterméket tartalmazó szerkezetben a két domén szétnyílt, és a kristályban szomszédos molekula egy régiója közéjük ékelődött.⁵⁻¹⁰

Az enzim dinamikus mozgásai helyett egy másik szubsztrát bejuttatási stratégiára lehetett következtetni a különböző dipeptidil-peptidáz IV szerkezetekből.^{11,12,13} Itt két lehetséges állandó bejárat is vezet az aktív helyhez, az egyik a két domén közötti oldalsó nyílás, a másik a propeller domén tengelyében levő csatorna, ami szélesebb, mint a prolil-

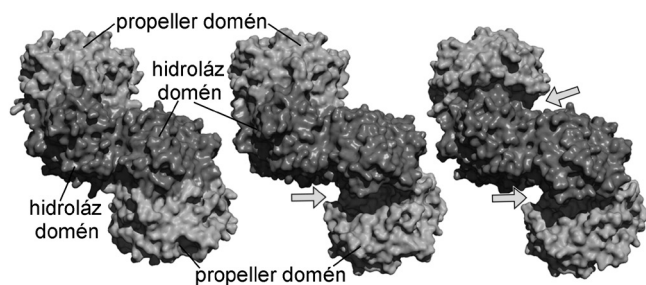
oligopeptidáz esetén (2. Ábra). A két domén egymáshoz képesti helyzetét a dipeptidil-peptidáz IV dimerben a két monomer közötti kölcsönhatások rögzítik.



2. Ábra. A dipeptidil-peptidáz IV szerkezete (dimer; balra: szalagmodell, jobbra: molekuláris felszín ábrázolása metszeti képen; nyilak jelzik a szubsztrát lehetséges bejutási útvonalait az aktív helyhez; PDB kód: 1nlm).

4. Szubsztrátszelekció acilaminoacil-peptidázokban: dinamikus doménmozgás

Az *Aeropyrum pernix*-ből származó dimer acilaminoacil-peptidáz első szerkezete a sertés protil-oligopeptidázhoz hasonlóan csukott konformációjú.¹⁴ Az enzim különböző variánsait kristályosítva sikerült olyan kristályait előállítanunk, amelyekben a dimer egyik vagy mindkét tagja nyitott¹⁵ (3. Ábra).

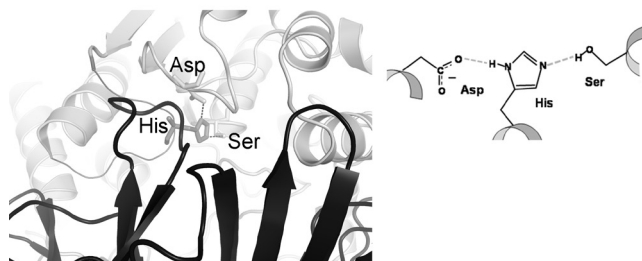


3. Ábra. Az *A. pernix* acilaminoacil-peptidáz dimerjének lehetséges konformációi. (molekuláris felszín; PDB kódok: a két monomer csukott/csukott 2hu5; nyitott/csukott 3o4g; nyitott/nyitott 3o4i).

A nyitott szerkezetek fontos tulajdonsága, hogy bár az aktív hely hozzáférhető lenne nagyobb fehérjék számára is, a katalitikus aminosavak elrendeződése megváltozott, ezért ez a konformációs állapot nem képes a peptid-hidrolízist katalizálni. Az enzim kinyílásakor a két domén közti másodlagos kölcsönhatások egy része megszűnik, több hurokrégió mozgékonyvá válik és elmozdul, köztük a katalitikus hisztidint hordozó hurok is. A szubsztrát-méretszelekció tehát azáltal valósul meg, hogy a szubsztrát hozzáférése az aktív helyhez és a katalitikus lépés az enzim különböző konformációs állapotokban történik meg (4. Ábra).

Mivel a nyitott és csukott állapotok közötti átmenet fehérjekristallográfiával közvetlenül nem vizsgálható, csak nagyon óvatos következtetések vonhatók le oldatban létrejövő konformációs átalakulások mechanizmusára. Az *Aeromonas punctata*-ból származó protil-oligopeptidáz vizsgálata során nyitott inaktív és csukott aktív konformációjú szerkezeteit is meghatározták.¹⁶ Azt tapasztalták, hogy

az enzim különböző mértékben lehet nyitott, de inhibitor-kötődés (szubsztrátanalóg kovalensen kötődő inhibitor) hatására az enzim molekulák becsukódtak, a komplexálatlan szerkezetek mind nyitottak, a szubsztrátkötött szerkezetek pedig csukottak. Ezért azt valószínűsítették, hogy az enzim becsukódása a szubsztrátkötés hatására, indukált illeszkedés mechanizmusával történik.



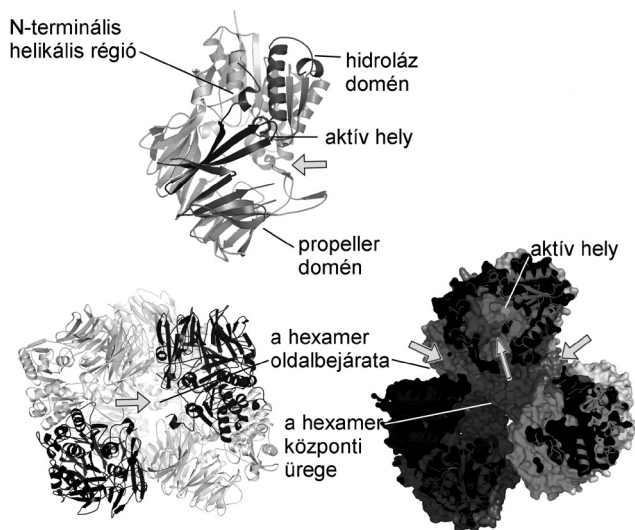
4. Ábra. Szubsztrát szelekció megvalósulása doménmozgás és a katalitikus hely torzulása révén (fekete: propeller domén, szürke: hidroláz domén; vékony vonal: hisztidint tartalmazó hurok). Fent: csukott szerkezet, a katalitikus triád katalitikusan aktív elrendeződésben van. Lent: nyitott szerkezet, a katalitikus hisztidin eltávolodott és rendezetlenné vált.

Az *A. pernix* acilaminoacil-peptidáz esetében a csukott szerkezetek egy része komplexálatlan, másik része ligandumkötött (az enzimreakció terméke vagy átmeneti állapot analóg inhibitor). Vannak olyan kristályszerkezetek, ahol a nyitott és csukott konformációjú molekulák együttesen vannak jelen, tehát hasonló energiájú konformációs állapotokról van szó. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy oldatban a nyitott és csukott forma egyensúlyakor a két forma összemérhető koncentrációban van jelen, és a szubsztrátkötés tolja el ezt az egyensúlyt: a csukott formát stabilizálja¹⁵ (konformációs szelekciós mechanizmus).

5. Szubsztrátszelekció acilaminoacil-peptidázokban: összefüggő üregrendszer

Különböző fajokból származó acilaminoacil-peptidázok különböző multimereket képeznek. Az *A. pernix* acilaminoacil-peptidáz dimer felépítésű, az emlősökben jelenlevő – gyógyászati szempontból is érdekes – tetramer acilaminoacil-peptidáz szerkezet-meghatározására irányuló kísérletek sikertelenek voltak. Meghatároztuk a szerkezetét a *Pyrococcus horikoshii*-ből származó acilaminoacil-peptidáznak,¹⁷ ami hexamer formában létezik. A hexamer merev felépítésű, két kristályformában, eltérő kristálybeli másodlagos kölcsönhatások sem befolyásolták a szerkezetét (a monomerek C α atomjai pozícióinak átlagos négyzetes eltérése 0,25-0,41 Å). A hexamer dimerek trimerje, ahol a hidroláz és propeller domének helyzetét a szomszéd molekulák közötti kölcsönhatások rögzítik (5. Ábra). A szubsztrát egy csatorna- és üregrendszeren keresztül

közelítheti meg a monomerek aktív helyét: a hexamer három oldalbejárata egy központi üregbe vezet, ahonnan a monomerek dipeptidil-peptidáz IV-hez hasonló, domének közötti oldalbejáraton keresztül jut be a monomer üregébe. Ez az üregrendszer biztosítja, hogy csak letekeredett, és oligopeptid mérettartományba eső peptidek jutnak el az aktív helyre. Az enzimnek ebben a 'félig nyitott' konformációjában, bár a propeller doménnel képezett, a katalitikus hisztidint hordozó hurok konformációját stabilizáló, másodlagos kölcsönhatások nagy része hiányzik, dipeptidil-peptidáz IV és a *P. horikoshii* acilaminoacil-peptidáz esetén is, az aktív hely nincs eltorzulva – ez a félig nyitott konformációs állapot katalitikusan aktív.



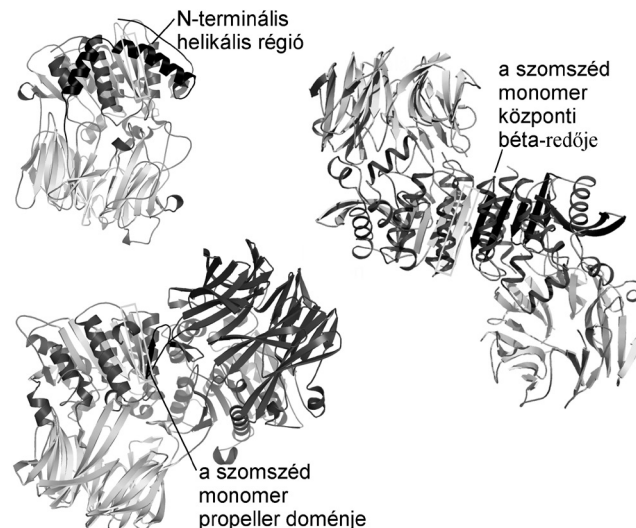
5. Ábra. A *P. horikoshii* acilaminoacil-peptidáz hexamerét felépítő monomer szerkezete (PDB kód: 4hxe), a hexamer (dimerek trimerje) és az aktív helyhez vezető üreg- és csatornarendszer (metszeti kép).

6. A multimerizáció szerkezeti szerepe

A különböző multimer acilaminoacil-peptidázok tehát különböző szubsztrátszelektív stratégiával működnek. A prolil-oligopeptidáz családon belül megismert szerkezetek érdekes különbségeket mutatnak a szubsztrátszelektív stratégia szerint: a kinyílásra és becsukódásra képes enzimek monomerek vagy olyan dimerek, amikben a két monomer közötti kölcsönhatások csak az egyik domént érintik (prolil-oligopeptidáz, oligopeptidáz B, *A. pernix* acilaminoacil-peptidáz); a merev, permanens oldalbejáratú rendelkező enzimek viszont olyan multimerok, ahol mindkét domén részt vesz a multimer másodlagos kölcsönhatásainak kialakításában (dipeptidil-peptidáz IV: dimer, *P. horikoshii* acilaminoacil-peptidáz: hexamer). Annak a vizsgálatára, hogy ez utóbbi enzimeknél a multimerizáció szerepe a félig nyitott állapot stabilizálása-e, molekuladinamikai szimulációt végeztünk, ami cáfolta ezt a feltételezést: a *P. horikoshii* acilaminoacil-peptidáz hexamerből kiemelt monomerjének a domén-elrendeződése időben stabil.

A különböző enzimek hidroláz doménje központi β -redőjének a szélső β -szálát (központi β -redő élet) megvizsgálva¹⁷ azt találtuk, hogy ez aggregációra, amiliodképzésre hajlamos, ún. ragadós β -él minden ismert szerkezetben. Ez a szerkezet szempontjából veszélyes szerkezeti rész azonban minden

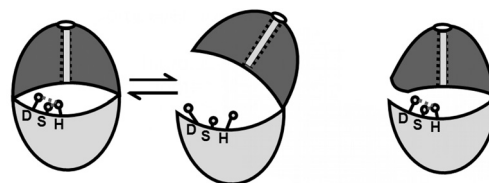
szerkezetben le van fedve: azokban az oligopeptidázokban, amik monomerek (prolil-oligopeptidáz, oligopeptidáz B), a helikális N-terminális peptidszakasszal. Azok az enzimek viszont, ahol ez a peptidszakasz túl rövid, multimerok, és a multimerben a szomszédos molekula látja el ezt a védelmi funkciót (6. Ábra).



6. Ábra. A hidroláz domén β -redőjének (világos szürke keretben) ragadós élet eltemető szerkezeti részek (fekete) prolil-oligopeptidázban (balra fent, PDB kód: 1qfs), *A. pernix* acilaminoacil-peptidázban (jobbra, PDB kód: 3o4g) és *P. horikoshii* acilaminoacil-peptidázban (balra lent, PDB kód: 4hxe).

7. Összefoglalás

Az oligopeptid szubsztrátok kiválasztása és proteolitikus aktivitás kettős funkciójának megvalósítására a prolil-oligopeptidáz családban két mechanizmust ismertünk meg. 1) nyitott, szubsztrátok számára hozzáférhető és csukott, katalitikusan aktív konformációs állapotok egymásba alakulása által; 2) egy olyan beléptető rendszer segítségével, amin való áthaladáshoz a szubsztrát letekeredése szükséges (7. Ábra).



7. Ábra. Szubsztrát-méretszelektív mechanizmusok sematikus ábrázolása (balra: dinamikus doménmozgás; jobbra: merev szerkezet csatorna és üregrendszer).

Mindkét mechanizmus előfordul ősbaktériumok, baktériumok és gerincesek oligopeptidáz enzimeiben, valamint különböző funkciójú enzimeknél is (doménmozgás: prolil-oligopeptidáz, oligopeptidáz B és *A. pernix* acilaminoacil-peptidáz; csatorna- és üregrendszer: dipeptidil-peptidáz IV és *P. horikoshii* acilaminoacil-peptidáz). Míg a hidroláz domének aminosav-szekvenciája jobban konzervált, a β -propeller domének nagy változatosságot mutatnak, nem konzervált sem a két domén közötti kölcsönható régió, ami szétválik az első csoportba tartozó enzimek kinyílásakor,

sem a merev multimerek stabilizálásában részt vevő régiók nagysága és helye az aminosav-szekvenciában. Ezek együttesen arra utalnak, hogy a kétféle mechanizmus különböző utakon, konvergens evolúcióval fejlődhetett ki az enzimes családon belül.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetét fejezi ki az OTKA (NK67800, NK101072, PD101095) támogatásáért, valamint az European Synchrotron Radiation Facility és EMBL-Hamburg Outstation sugárforrásoknak nyálábíró biztosításáért.

Hivatkozások

1. Fülöp, V.; Böcskei, Z.; Polgár, L. *Cell*, **1998**, *94*, 161-70.
2. Polgár, L. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 349-362.
3. Rosenblum, J. S.; Kozarich, J. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 496-504.
4. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. *Nucleic Acids Research*, **2000**, *28*, 235-242.
5. Szeltner, Z., Rea, D., Juhász, T., Renner, V., Fülöp, V., Polgár, L. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 627-637.
6. Fuxreiter, M., Magyar, C., Juhász, T., Szeltner, Z., Polgár, L., Simon, I., *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, *60*, 504-512.
7. Shan, L.; Mathews, I. I.; Khosla, C. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2005**, *102*, 3599-3604.
8. Li, M., Chen, C., Davies, D. R. & Chiu, T. K. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 21487-21495.
9. Kaszuba, K., Róg, T., Danne, R., Canning, P., Fülöp, V., Juhász, T., Szeltner, Z., St Pierre J-F., García-Horsman, A., Männistö, P. T., Karttunen, M., Hokkanen, J. & Bunker A. *Biochimie*, **2012**, *94*, 1398-1411.
10. Canning, P., Rea, D., Morty, R. E.; Fülöp, V. *PLoS One.*, **2013**, *8*, e79349.
11. Rasmussen, H. B., Branner, S., Wiberg, F. C.; Wagtmann, N. *Nat. Struct. Biol.*, **2003**, *10*, 19-25.
12. Hiramatsu, H., Kyono, K., Higashiyama, Y., Fukushima, C., Shima, H., Sugiyama, S., Inaka, K., Yamamoto, A.; Shimizu, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 849-854.
13. Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H. U.; Brandstetter, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2003**, *100*, 5063-5068.
14. Bartlam, M., Wang, G., Yang, H., Gao, R., Zhao, X., Xie, G., Cao, S., Feng, Y.; Rao, Z. *Structure.*, **2004**, *12*, 1481-1488.
15. Harmat, V., Domokos, K., Menyhárd, D. K., Palló, A., Szeltner, Z., Szamosi, I., Beke-Somfai, T., Náray-Szabó, G.; Polgár, L. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 1987-1998.
16. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., Richardson, D. *Acta Cryst.* **2010**, *D66*, 12-21.
17. Menyhárd, D. K., Kiss-Szemán, A., Tichy-Rács, É., Hornung, B., Rádi, K., Szeltner, Z., Domokos, K., Szamosi, I., Náray-Szabó, G., Polgár, L.; Harmat, V. *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 17884-17894.

Self-assembly and flexibility: substrate selection strategies in oligopeptidases

Members of the prolyl oligopeptidase family are two-domain serine proteases with double function: size selection of their substrates (maximum size limited to oligopeptides) and proteolytic activity. Crystal structures helped to understand the two strategies for fulfilling this double function are reviewed in this paper. Two conformational states were found for prolyl oligopeptidase, oligopeptidase B and *Aeropyrum pernix* acylaminoacyl peptidase: The closed form with its catalytic triad in active configuration is responsible for catalytic activity, but substrate access to the active site is hindered as there are only narrow channels leading to the inner cavity of the enzyme containing the active site. The

open form with distorted active site is responsible for effective substrate access. The equilibrium and transition between the two forms either by substrate induction or by conformational selection mechanism ensures the size limitation of the substrates. In contrast, the second group of the oligopeptidases, dipeptidyl peptidase IV enzymes and *Pyrococcus horikoshii* acylaminoacyl peptidase have permanent side opening (for dipeptidyl peptidase IV also a wide pore through its propeller domain) and they form rigid multimers where the substrate can access the active sites through a channel and/or chamber system (for *P. horikoshii* acylaminoacyl peptidase hexamers: self-compartmentalization). In this case the substrate must pass the channel(s) to reach the active site, that is why only unfolded peptides in the oligopeptide size range are the substrates of these enzymes.